云　南　植　物　研　究　2006，28（4）：410～414
Acta Botanica Yunnanica

夏枯草多糖的分离纯化与抗氧化活性研究

张德华

（皖西学院化学与生命科学系，安徽 六安　237012）

摘要：对夏枯草多糖（PP2）的分离纯化方法作了探讨，通过正交试验，筛选出多糖提取条件的最佳组合。采用纸层析、琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法对多糖纯度进行鉴定。通过气相色谱仪对多糖的单糖组成进行分析。通过体外化学模拟，研究夏枯草多糖的抗氧化性。实验表明，夏枯草多糖对 O_2^-·、·OH 二种自由基及亚硝酸根离子具有一定的清除能力，对 R·自由基的清除较弱，具有防止膜脂质过氧化，减少红细胞溶血和降低脂质过氧化产物丙二醛的生成量的作用。

关键词：夏枯草；多糖；抗氧化

中图分类号：Q 946　　　　**文献标识码**：A　　　　**文章编号**：0253-2700(2006)04-410-05

Isolation，Purification and Antioxidant Activity of the Polysaccharide of *Prunella vugaris* (Labiatae)

ZHANG De-Hua

(*Department of Chemistry and Life Science*，*West Anhui University*，Lu'an 237012，China)

Abstract：This report described the isolation and purification of the polysaccharide from *Prunella vugaris* L.（PP2）. The best combination of isolation conditions had been obtained through the orthogonal experiment. Paper Chromatography，agarose gel electrophoresis and ultraviolet spectroscopy had been introduced to determine the purity of the PP2 and fractional deposition and gas chromatography had been applied to analyze the monosaccharide constituents of PP2. By the chemical simulation *in vitro*，the antioxidant activity of PP2 had been studied. The results of the experiment showed that PP2 had significant scavenging effect on oxide radical，hydroxide radical and univalent radical NO_2 but poor scavenging effect on organic radical. PP2 could prevent the membrane lipid from peroxidation and reduce hemolysis of red cells and production of MDA as well.

Key words：*Prunella vugaris*；Polysaccharide；Antioxidation

夏枯草（*Prunella vugaris* L.）为唇形科（Labiatae）夏枯草属（*Prunella*）植物，多年生草本。生于荒地、路旁及丘陵山坡草丛中，以山区较多。主产于江苏、安徽、浙江、河南等省。夏枯草的干燥果穗和全草均可入药。具有清肝火、明目、散热、利尿功能。主治头昏目眩、筋骨疼痛、高血压等（肖培根等，2002）。夏枯草嫩茎叶或花穗也可食用，不仅味道鲜美，还有助于增强人体免疫等功能（陈吉飞等，2001）。

有关夏枯草的药材鉴别、栽培、化学成分的报道较多（浦湘渝和周俊，1987；张颖君和杨崇仁，1995；徐仲仙等，1996；罗目和等，2005）。但关于夏枯草多糖的提取和抗氧化性的研究未见报道，本文进行了夏枯草多糖的分离纯化、单糖组成分析。着重研究了多糖在体外化学模拟条件下，对超氧阴离子自由基、羟自由基、脂质自由基和亚硝酸根离子的清除作用。在亚细胞和组织水平上研究了多糖在降低膜脂质过氧化、减少红细胞溶血性的能力。以期为夏枯草多糖功能性食品的开发利用提供理论依据。

基金项目：安徽省教育厅自然科学基金（No.2006KJ233B）
收稿日期：2005-10-24，2006-02-22 接受发表
作者简介：张德华（1957-）男，副教授，研究方向为生物技术及天然产物的开发。E-mail：zdhla@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

夏枯草采自大别山区霍山县，全草 60℃烘干，粉碎过 40 目筛。昆明种小鼠，由安徽医科大学动物实验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 多糖的提取　称取夏枯草粉末，加石油醚(70℃)回流脱脂 2 次，回收石油醚，固形物中加 80%的乙醇(90℃)回流 2 次，去除低聚糖及其它醇溶性物质，挥干溶媒，加水于水浴中提取，提取液经减压浓缩、乙醇沉淀 12 h，95%乙醇、无水乙醇、丙酮、乙醚分别洗涤 2 次，烘干得夏枯草粗多糖(PP1)。

1.2.2 分离纯化　将 PP1 溶解后脱蛋白，依次用三氯乙酸法、盐酸法、鞣酸沉淀法和 Sevag 法(Staub，1956) 4 种脱蛋白方法各 1 次，合并上述脱蛋白糖液。再用 0.5 mol L NaOH 溶液中和至中性，用 1 g 活性炭粉末回流提取 1 h，脱色，离心(4000 *r* min，10 min)，除去沉淀得上清夜。将上清液装入透析袋(Spectra por 2 再生纤维素膜)中，流水透析 40 h，减压浓缩、醇沉、洗涤 2 次(无水乙醇、丙酮、乙醚)，干燥得夏枯草精多糖(PP2)。

1.2.3 多糖含量测定

PP1 总糖测定：采用硫酸 - 苯酚法(周燕霞，2003)，以葡萄糖为标准品。

PP1 还原糖测定：斐林试剂直接滴定法。PP1 粗多糖含量 = PP1 总糖—PP1 还原糖

1.2.4 单糖组成分析　称取 PP2 10 mg，加入 2 mol L 三氟乙酸 3 ml，在 100℃水浴锅中密闭水解 6 h，以碳酸钡中和至 pH7～8，离心，取上清液，减压蒸发至干，重复 1 次。再加入 10 mg 盐酸羟胺，0.5 ml 吡啶，放入 90℃水浴加热反应 30 min 并振荡。取出冷至室温，加入 0.5 ml 醋酸酐，在 90℃继续反应 30 min，乙酰化完成，反应产物直接用于气相色谱分析。以鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖为对照的标准单糖，同样处理后进行气相色谱分析。

1.2.5 多糖的分级　采用甲醇分级沉淀(张憔杰，1987)

1.2.6 纯度鉴定

1.2.6.1 紫外分光光度法　将 PP2 配成 500 μg mL 的溶液，作紫外光谱分析，测 PP2 的吸光度。紫外光谱扫描 250～280 nm 是否有特征吸收。

1.2.6.2 纸层析法　新华 2 号滤纸，点样量为 0.5%精多糖(PP2b)水溶液 20 μl，展开剂(吕燕等，2001)为正丁醇∶浓氨水∶水(40∶50∶5)，饱和 2 h，上行层析，室温展开 6 h，取出后吹干，染色液 0.5%甲苯胺蓝，95%乙醇漂洗至背景褪色，吹干。

1.2.6.3 琼脂糖凝胶电泳　胶浓度 0.6%，厚 3 mm；上样液：PP2b 溶液 20 μl(2 mg ml)，10%甘油 5 μl。指示剂：溴酚蓝。电泳缓冲液：0.075 mol L 巴比妥缓冲液(pH8.6)；电压：110 V，电泳 2 h；染色液 0.1%甲苯胺蓝；脱色液为乙醇∶水∶醋酸 = 5∶5∶0.1。

1.2.7 抗氧化活性研究

1.2.7.1 多糖对 O_2^-·的清除作用　参考 Hassan(1984)的光化学方法略有改动。反应体系包括 2.4×10^{-6} mol L RFV、0.01 mol L Met、1.67×10^{-4} mol L NBT、0.1 mol L 磷酸缓冲液(pH8.0)和不同浓度的多糖。在 560 nm 处测各浓度下的吸光度 Ax，便能测定夏枯草多糖对 O_2^-·的清除作用。

1.2.7.2 多糖对·OH 的清除作用　以 Smirnoff 等(1989)的方法为基础并改进。3 ml 反应液含 0.15 mol L $FeSO_4$，6 mmol L H_2O_2，2 mmol L 水杨酸钠和不同质量浓度的 PP2，最后加 H_2O_2 启动反应，37℃反应 1 h，测 510 nm OD 值，吸光值越小，清除效果越好。

1.2.7.3 多糖对 R·的清除　按周志刚等(1997)的方法。

1.2.7.4 模拟胃液条件下多糖对亚硝酸钠的清除　按谢祥茂等(2001)的方法。

1.2.7.5 PP2 抗 H_2O_2 引起的小鼠肝组织丙二醛(MDA)的生成　按向荣等(1990)的方法。

1.2.7.6 PP2 对 H_2O_2 诱导的红细胞氧化溶血的抑制作用　按李志孝等(2000)的方法。

表 1　粗多糖提取实验 $L_9(3^4)$ 正交表

Table 1　The orthogonal table derived from the experiment of polysaccharide extraction

试验号 Experiment No.	水提温度(℃) Temperature	水提时间(h) Time	料液比 The ratio of solid to solution	水提次数 Frequency	多糖含量(%) Polysaccharide content
1	80	4	10	1	10.9
2	80	5	20	2	11.3
3	80	6	30	3	11.7
4	90	4	20	3	14.7
5	90	5	30	1	12.1
6	90	6	10	2	9.8
7	100	4	30	2	10.1
8	100	5	10	3	13.5
9	100	6	20	1	11.4
k1	11.3	11.9	11.4	11.5	
k2	12.2	12.3	12.5	10.4	
k3	11.7	11	11.3	13.3	
R	0.9	1.3	1.2	2.9	

2 结果与分析

2.1 夏枯草多糖提取的工艺条件

根据单因素初步试验，影响夏枯草多糖提取率的主要因素有提取温度、时间、料液比、次数等，采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计(表 1)。根据各实验因素水平，取定容至 250 ml 的浓缩液 2

ml，定容至 100 ml，用硫酸 - 苯酚法测其吸光度，换算出 PP1 粗多糖含量（%）。

由以上正交试验及极差分析结果表明各因素对夏枯草多糖提取率影响的顺序为：水提次数 > 时间 > 料液比 > 温度。最优水平组合为温度 90℃，提取时间 4 h，料液比 1∶20，水提取 3 次。

2.2　多糖含量

测得每 100 g 风干材料获 PP1 总糖含量为 17.07 g，粗多糖含量为 14.7 g，粗多糖占总糖百分率为 86.1%。

2.3　单糖组成

根据图 1 和图 2 得出的表 2 和表 3，可看出 PP2 中单糖至少由鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖等组成。

2.4　甲醇分级沉淀获级分 PP2a、PP2b、PP2c。各部分酸解后，经气相色谱分析其组成（表 4）。

表 2　标准单糖的气相色谱表

Table 2　The list of the constitute of standard monosaccharide by gas chromatography

单糖组成 Composing	鼠李糖 Rhamnose	木糖 Xylose	阿拉伯糖 Arabinose	甘露糖 Mannoes	葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose
出峰时间 min	10.5	11.3	12.1	15.2	20.3	23.8

表 3　多糖 PP2 的单糖组成气相色谱表

Table 3　The list of the constitute of monosaccharide from PP2 by gas chromatography

单糖组成 Composing	鼠李糖 Rhamnose	木糖 Xylose	阿拉伯糖 Arabinose	甘露糖 Mannoes	葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose
出峰时间 min	10.2	11.1	12.2	15.4	20.5	23.7

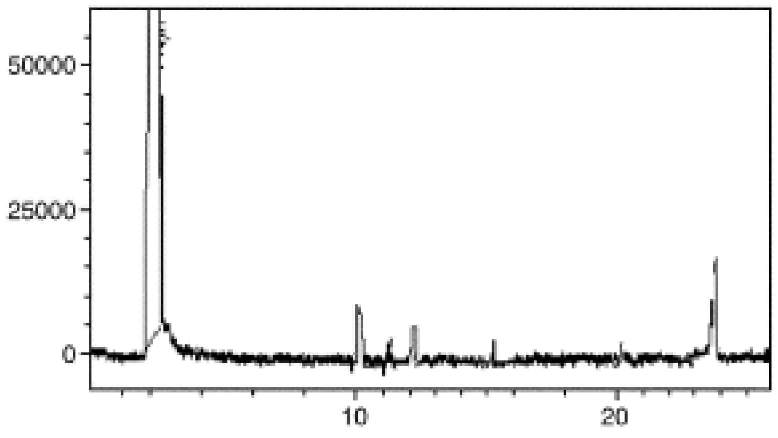

图 1　标准单糖的气相色谱图

Fig . 1　Gas chromatogram of standard monosaccharide

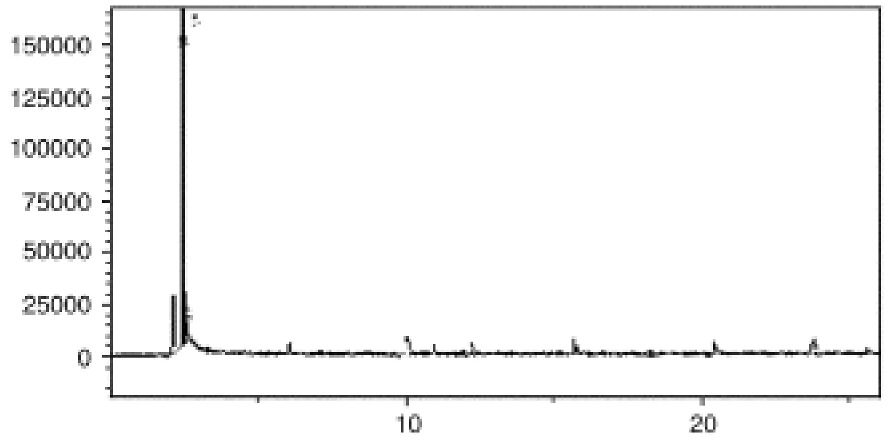

图 2　PP2 的气相色谱图

Fig . 2　Gas chromatogram of PP2

表 4　甲醇分级夏枯草多糖

Table 4　Fractional deposition of PP2 by methanol

沉淀时甲醇浓度（%） Concentration of methanol	级分 Fractional	沉淀量（%） Deposition	组成 Composing 鼠李糖 Rhamnose	木糖 Xylose	阿拉伯糖 Arabinose	甘露糖 Mannose	葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose
33	PP2a	19	—	—	—	—	+++	—
33-50	PP2b	38	+	—	+	++	+	+
50-60	PP2c	24	—	+	+	+	—	+

从表 4 可知 PP2a 为单一级分的葡聚糖，其它级分为杂多糖。

2.5　纯度鉴定

根据图 3 的紫外光谱图，夏枯草多糖 PP2 的吸光度在 250～280 nm 无吸收峰，表明样品中已检测不出蛋白质、多肽、核酸。

夏枯草多糖 PP2b 纸层析得单一紫红色斑点，颜色深浅均匀（图 4 左）。PP2b 琼脂糖凝胶电泳结果只有一条带，表明无其它杂质（图 4 右）。

2.6　夏枯草多糖抗氧化活性

2.6.1　多糖清除自由基活性结果　本实验在体外设计产生 $O_2^- \cdot$、·OH 和 R·3 个体系中，分别加入不同浓度的夏枯草多糖粗品和精品，实验结果见表 5。由表 5 可知，夏枯草多糖对 $O_2^- \cdot$ 和·OH 都有清除作用，清除能力与多糖的浓度成正相关。夏枯草多糖对 R·清除能力较弱，并且不

显示量效关系。

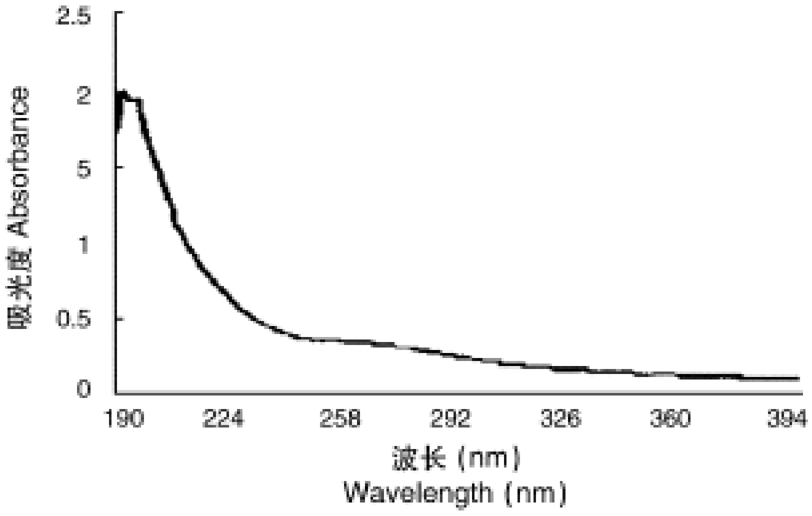

图 3　夏枯草多糖 (PP2) 的紫外图谱

Fig . 3　UV spectrum of PP2

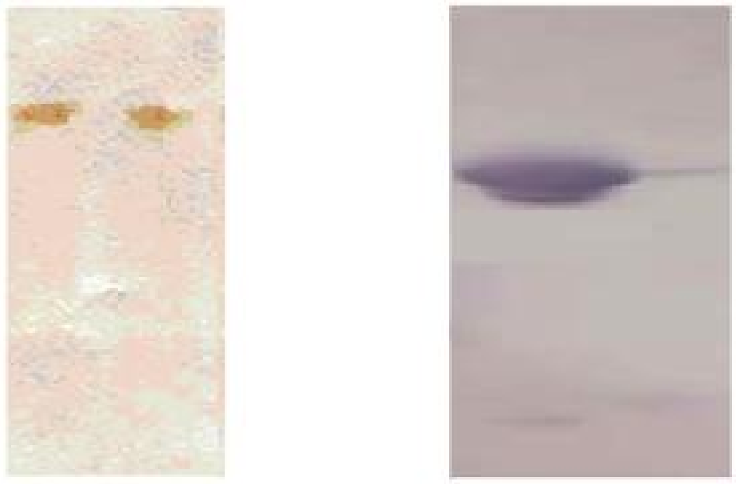

图 4　PP2b 的纸层析 (左) 和琼脂糖凝胶电泳图 (右)

Fig . 4　Paper Chromatogram of PP2b (left) and agarose gel electrophoresis pattern (right)

表 5　夏枯草多糖对 $O_2^{-}\cdot$，$\cdot OH$ 和 R·的清除效果

Table 5　The scavenging effect of PP2 on $O_2^{-}\cdot$，$\cdot OH$ and R·free radical

样品类型 Sample category	多糖浓度 (g ml) Concentration	$O_2^{-}\cdot$ 清除率 (%) Scavenging rate	·OH 清除率 (%) Scavenging rate	R·清除率 (%) Scavenging rate
粗品	0.001	8.3	13.2	18.0
粗品	0.01	25.3	32.8	12.5
粗品	0.05	42.1	45.4	7.8
粗品	0.1	55.9	66.5	5.5
粗品	0.5	63.1	84.1	2.1
精品	0.001	5.5	11.3	12.5
精品	0.01	16.3	25.7	9.1
精品	0.05	31.2	43.9	5.1
精品	0.1	38.5	57.2	1.9
精品	0.5	45.7	73.1	1.2

实验表明夏枯草多糖粗品比精品抗氧化活性要强些 (表 5)。此现象可能是在脱蛋白、脱色素等过程中，损失了某些糖蛋白和非多糖抗氧化成分。

2.6.2　模拟胃液条件下多糖对 $NaNO_2$ 的清除效果

表 6 数值说明 PP2 多糖的浓度与 NO_2^- 清除率之间呈量效关系，Vc 为阳性对照。

表 6　PP2 对 $NaNO_2$ 的清除作用

Table 6　The scavenging effect of PP2 on $NaNO_2$

PP2 (μg ml)	Vc (μg ml)	$NaNO_2$ 清除率 (%)
250		51.21
300		59.03
400		74.16
500		89.35
	200	87.76

不同 pH 和不同作用时间对各种多糖消除 $NaNO_2$ 的影响基本相似，在 pH2 - 5 条件下，提取液对 NO_2^- 清除量在前 30 min 是随时间而增加，以后随时间延长，NO_2^- 的清除逐渐趋于平衡。在低 pH 值 (2 - 3) 条件下，提取液对 NO_2^- 的清除能力高于 pH (4～7) 值，而且随着 pH 值的升高，NO_2^- 清除量下降。

2.6.3　PP2 对肝组织脂质过氧化产物丙二醛生成的影响

从表 7 知，$Fe^{2+} + H_2O_2$ 组丙二醛含量比对照组有所增加，说明 $Fe^{2+} + H_2O_2$ 产生的·OH 可诱导脂质过氧化反应，在有 PP2 时，丙二醛生成量比 $Fe^{2+} + H_2O_2$ 组明显减少，且随着 PP2 质量浓度的增加，丙二醛生成量有明显的减小，说明 PP2 能强烈地抑制·OH 诱导的脂质过氧化作用，Vc 为阳性对照。

表 7　PP2 对 $Fe^{2+} + H_2O_2$ 诱导的小鼠肝组织丙二醛生成的影响

Table 7　The Effect of PP2 on MDA formation by $FeSO_4 + H_2O_2$ system in mice liver in vitro

实验组 Experimental group	PP2 $\mu g \cdot mL^{-1}$	A532 nm	抑制率 % Inhibiting rate
对照组	0	$0.259 \pm 0.062^{***}$	
$Fe^{2+} + H_2O_2$	0	1.736 ± 0.134	
$Fe^{2+} + H_2O_2$ + 多糖	100	1.598 ± 0.138	7.9
	200	$1.451 \pm 0.142^{*}$	16.4
	400	$1.086 \pm 0.076^{***}$	37.4
	800	$0.891 \pm 0.169^{***}$	48.7
	1600	$0.634 \pm 0.221^{***}$	63.5
$Fe^{2+} + H_2O_2$ + Vc (200 $\mu g \cdot mL^{-1}$)		$0.753 \pm 0.113^{***}$	56.6

n = 5； * $P < 0.05$； *** $P < 0.001$； vs $Fe^{2+} + H_2O_2$.

2.6.4　PP2 对 H_2O_2 诱导小鼠红细胞溶血的影响

从表 8 可知 H_2O_2 组的 OD 值远比对照组大，说明 H_2O_2 能明显地引起红细胞溶血，即红细胞膜受到影响，当在 H_2O_2 体系中加入 PP2 后，溶

血显著降低，说明 PP2 可抑制红细胞氧化作用，且抑制率和 PP2 的质量浓度成量效关系，Vc 为阳性对照。

表 8 PP2 对 H_2O_2 诱导小鼠红细胞溶血的影响

Table 8 Effect of PP2 on the hemolysis of rat RBC induced by H_2O_2

实验组 Experimental group	PP2 μg·mL^{-1}	A415 nm	溶血度	抑制率 % Inhibiting rate
对照组	0	0.157±0.032		
Fe^{2+} + H_2O_2	0	0.562±0.034	100	0
Fe^{2+} + H_2O_2 + 多糖	200	0.498±0.036	88.6	11.4
	400	0.398±0.041*	70.8	29.2
	800	0.266±0.048**	47.3	52.7
Fe^{2+} + H_2O_2 + Vc (200 μg·mL^{-1})		0.241±0.031**	42.9	57.1

n = 3； * $P < 0.05$； ** $P < 0.01$； vs H_2O_2

3 结论

夏枯草多糖热水浸提的最佳工艺条件是：温度 90℃，提取时间 4 h，料液比 1∶20，水提取 3 次。

PP2 在紫外光谱图，显示样品无蛋白质、多肽和核酸；PP2b 纸层析及琼脂糖凝胶电泳，结果说明 PP2b 为均一多糖，不含有其它成分。

在脱蛋白工艺上，采用 4 种方法联合，使溶液中结合蛋白和游离蛋白去除更彻底。

PP2 经气相色谱分析，表明由鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖等单糖组成。

在化学模拟体系、亚细胞器和组织水平上对夏枯草多糖的抗氧化作用进行评价：①PP2 有较高的清除·OH 自由基、O_2^-·自由基和亚硝酸根离子的能力，在一定浓度范围内清除率与浓度剂量呈正相关，但对 R·的清除能力较弱。② PP2 具有防止膜脂质过氧化的作用，从而减少红细胞溶血和降低脂质过氧化产物丙二醛的生成量。

夏枯草多糖具有良好的抗氧化性能，根据自由基理论，应具有开发为功能性保健食品的潜在价值。

参 考 文 献

肖培根，李大鹏，杨世林，2002．新编中药志［M］．北京：化学工业出版社，763—770

张惟杰，1987．复合多糖生化研究技术［M］．上海：上海科技出版社，193—199

Chen JF (陈吉飞)，Li HJ (李惠均)，2001．Fine vegetable and good medicine—— *Prunella vugaris* ［J］．*Forest and Humankind* (森林与人类)，2：38

Hassan HM，1984．Determination of micobial damage caused by oxygen free radicals，and the protective rule of superoxide diserntase［A］．In：Packer Led.，Methods in Enzymology［M］．New York：Academic Press，105：404—412

Li ZX (李志孝)，Huang CG (黄成钢)，Cai YJ (蔡育军)，*et al*，2000．The Chemical Structure and Antioxidative Activity of Polysaccharide from *Asparagus cochinchinensis* ［J］．*Acta Pharmaceutica Sinica* (药学学报)，35 (5)：358—362

Lu Y (吕燕)，Chen H (陈颢)，Wang SJ (汪水娟)，*et al*，2001．Isolation，Purification and Structural Analysis of Polysaccharides from *Porphyra haitanensis* ［J］．*Journal of Nanjing University* (Natural Sciences) (南京大学学报)，37 (2)：240—245

Luo MH (罗目和)，Zhou RB (周日宝)，Tong QZ (童巧珍)，*et al*，2005．A Study on the Optimum Picking Period for *Prunella vugaris* L．Cultivated in a Standardized Way［J］．*Journal of Traditional Chinese Medicine University of Hunan* (湖南中医学院学报)，25 (1)：12—14

Pu XY (浦湘渝)，Zhou J (周俊)，1987．A new triterpenoid compound of *Prunella hispida* ［J］．*Acta Bot Yunnan* (云南植物研究)，9 (4)：503—504

Smirnoff N，Cumbes QJ，1989．Hyroxyl radical scavenging activity of compatible solutes［J］．*Phytochemistry*，28 (4)：1057—1060

Staub AM，1956．Removal of proteins-Sevag method［J］．*Methods in Carbohydrate Chem*，28：350—356

Xiang R (向荣)，Wang D (王鼎)，1990．Improvement of the UV Spectrophotometer method for determining Lipid peroxidation by thiobarbituric acid［J］．*Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学与生物物理进展)，17 (3)：241—242

Xie XM (谢祥茂)，Ding XW (丁小雯)，Chen JQ (陈俊琴)，2001．Study on the Extract of Rosa Laevigata Michx to Remove NO_2^- in vitro Experiment［J］．*Food Science* (食品科学)，22 (1)：30—33

Xu ZX (徐仲仙)，Zhou JQ (周菁齐)，Xu SL (徐声林)，*et al*，1996．A review of progress in chemical constituents and bioactivity of *Prunella vugaris* ［J］．*Chinese Traditional Patent Medicine* (中成药)，18 (11)：42

Zhang YJ (张颖君)，Yang CR (杨崇仁)，1995．Two new ursane glycosides from *Prunella vulgaris* in France［J］．*Acta Bot Yunnan* (云南植物研究)，17 (4)：468—472

Zhou YX (周燕霞)，Tang ML (唐明林)，Yin HA (殷辉安)，*et al*，2003．An Lian-Ying．Extraction and Content Determination of Polysaccharides from Poria cocos［J］．*Natural Product Research and Development* (天然产物研究与开发)，15 (4)：330—333

Zhou ZG (周志刚)，Liu ZL (刘志礼)，Liu XX (刘雪娴)，1997．Study on the Isolation，Purification and Antioxidation Properties of Polysaccharides from *Spirulina maxima* ［J］．*Acta Bot Sin* (植物学报)，39 (1)：77—81